

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 195 36 166 C 1

51 Int. Cl. 6:
C 07 K 14/20
G 01 N 33/571
C 07 K 16/12

21 Aktenzeichen: 195 36 166.0-41
22 Anmeldetag: 29. 9. 95
43 Offenlegungstag: —
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 6. 3. 97

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Krell, Siegfried, Dr., 39108 Magdeburg, DE

74 Vertreter:

Einsel, M., Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 38102
Braunschweig

72 Erfinder:

Krell, Siegfried, Dr., 39108 Magdeburg, DE; Gerber,
Annegret, Dipl.-Biol., 39108 Magdeburg, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 52 64 360

54 Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* (Syphilis)

57 Ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* wird vorgeschlagen, bei dem eine Auswahl von rekombinanten Antigenen genamplifiziert und kloniert wird, wobei die Auswahl der rekombinanten Antigene zum nachweisen von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* das 17 kD-Antigen, das 47 kD-Antigen und TmpA enthält, anschließend diese genamplifizierten und klonierten Antigene in Wirtsvektorsystemen exprimiert und dann gereinigt werden, danach die gereinigten Antigene einzeln oder in Kombination an eine feste Phase gebunden werden, danach die an die feste Phase gebundenen Antigene einer Reaktion mit einem auf Antikörper hin zu untersuchenden Material, insbesondere Körperflüssigkeit, ausgesetzt werden, und danach die mittels Antigen-Antikörperreaktion gebundenen Antikörper aus dem zu untersuchenden Material mittels eines Detektionssystems qualitativ und/oder quantitativ festgestellt werden.

DE 195 36 166 C 1

DE 195 36 166 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mittel und ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum*.

Treponema pallidum ist der Erreger der Syphilis. Eine Diagnosestellung für Infektionen mit diesem Krankheitserreger ist nicht nur in Verdachtsfällen wichtig; von großer Bedeutung ist es, eine Syphilis zum einen bei Schwangeren und zum anderen bei Blutspendern auszuschließen. In der Schwangerenvorsorge dient dies der Prävention einer konnatalen Syphilis also der Übertragung der Syphilis auf das Neugeborene und dessen möglicher Schädigung. Bei Blutspendern ist eine negative Syphilisserologie ein Spenderauswahlkriterium.

Die Syphilisdiagnostik ist in erster Linie serologisch, d. h. durch den Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* und/oder Cardiolipin. Bereits 14 Tage nach Infektion sind spezifische IgM- und spätestens 4 Wochen nach Infektion IgG-Antikörper nachweisbar. Nur in der davorliegenden Zeit ist direkter Erregernachweis aus dem infizierten Gewebe des Primäraffektes ein weiteres entscheidendes diagnostisches Kriterium.

Eine Diagnosestellung durch kulturellen Nachweis, wie sonst für viele andere bakterielle Krankheitserreger üblich, ist nicht möglich, da eine *in vitro*-Kultur von *Treponema pallidum* bisher nicht gelungen ist, abgesehen von einer Passagierung auf Zellkulturen (US 5,264,360 A).

Die Nachweismethoden für die serologische Diagnostik lassen sich nach der Natur der nachgewiesenen Antikörper in drei Gruppen einteilen:

1. Nicht-Treponemen-spezifische Tests

Auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Cardiolipin basieren Tests wie der Cardiolipin-Mikroflokkungstest (CMT), der im englischsprachigen Raum als Veneral Disease Laboratory Test (VDRL-Test) bezeichnet wird, der "rapid plasma reagin test" (RPR-Test) und die Cardiolipin-Komplementbindungsreaktion (Cardiolipin-KBR). Diese Tests werden 3–5 Wochen nach Infektion bzw. etwa 7–10 Tage nach Erscheinen des Primäraffektes positiv. Die Sensitivität beträgt 60 bis 87% im Primärstadium und kann 100% bei der Sekundärsyphilis erreichen. Die Sensitivität fällt jedoch im weiteren Krankheitsverlauf, so daß bis zu 30% der Spätstadien nicht mehr reaktiv sind. Bei quantitativer Durchführung des VDRL-Tests ist eine Titerabhängigkeit von der Krankheitsaktivität zu verzeichnen. Nachteil dieser Tests ist der hohe Anteil von 0,3–0,9% falsch positiven Testergebnisse bei Untersuchung von Blutspendenserum sowie das Vorkommen falsch negativer Ergebnisse bei hochtitrigen Seren infolge Prozonophänomens, das bei Sekundärsyphilis im VDRL-Test in 1 bis 2% der Fälle beobachtet werden kann.

2. Treponemen-spezifische Tests

Im Verlauf der Syphilis werden gegen Endoflagellen von *Treponema pallidum* Antikörper gebildet. Auf Grund von Antigenverwandtschaften reagieren diese Antikörper auch mit Endoflagellen anderer Treponemenspecies. Für die Syphilisdiagnostik wurden deshalb auch Endoflagellen von *Treponema phagedenis* (Biotyp Reiter) als Antigen eingesetzt (Flagellum-ELISA, R. V. W. Van Eijk et al., 1988). Bei Flagellum-ELISA stellt

der Grenzwert für ein positives Testergebnis einen Kompromiß bezüglich Sensitivität und Spezifität dar. Damit sind 0,8% falsch positive und 2,7% falsch negative Testergebnisse zu verzeichnen.

3. *Treponema-pallidum*-spezifische Tests

Diese Tests weisen Antikörper nach, die mit *T. pallidum* oder Antigenpräparationen aus dem Erreger reagieren. Zu diesen Testsystemen gehören der *Treponema-pallidum*-Hämagglutinationstest (TPHA), der Fluoreszenz-*Treponema-pallidum*-Antikörper-Absorptionstest (FTA-ABS) und der Nelson-Test (*T. pallidum*-Immobilisationstest, TPI) sowie ELISA-Systeme auf der Basis von Sonikatantigen. In der Diagnostik werden vorrangig TPHA und FTA-ABS eingesetzt.

Beim Nelson-Test wird mikroskopisch beurteilt, wie komplementaktivierende Antikörper im Patientenserum die Beweglichkeit von *Treponema pallidum* hemmen. Der Nelson-Test wird wegen des hohen Aufwandes fast nur noch zu wissenschaftlichen Fragestellungen eingesetzt.

Beim TPHA werden Erythrozyten, an die *Treponema pallidum*-Sonikatantigen gebunden ist, durch Antikörper aus Syphilispatientenserum agglutiniert. Der TPHA weist mit 0,07% falsch positiven und 0,008% falsch negativen Ergebnissen eine hohe Spezifität und Sensitivität auf, wobei die meisten falsch negativen Ergebnisse die Frühphase der Syphilis betreffen. Der TPHA wird in der 4. Woche der Infektion positiv, zeigt bei Primärsyphilis eine Sensitivität von 64% bis 87% mit zunächst geringer Titerhöhe (80–320), die beim Übergang zur Sekundärsyphilis auf über 5000 bei einer Sensitivität von 100% ansteigen kann. Im weiteren Verlauf bleibt der TPHA positiv bei einer Tendenz zum Titerabfall im latenten Stadium.

Beim FTA-ABS wird die Bindung von spezifischen Antikörpern im Untersuchungsserum an objektträgerfixierte *Treponema pallidum* über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Sensitivität des Nachweises beträgt in der Primärsyphilis 86% bis 100%, erreicht in der Sekundärsyphilis 100% und in den Spätstadien 96% bis 100%. Die Sensitivität für alle Stadien liegt verschiedenen Angaben zufolge zwischen 83% und 95%. Die Spezifität ist mit 83% bis 89% (ohne "borderline"-Befunde) nicht sehr hoch. Isoliert FTA-positive Seren bei negativer übriger Syphilisserologie sind z. B. durch Lyme-Borreliose bedingt. Der FTA-ABS wird als Bestätigungstest zur Absicherung positiver TPHA-Befunde durchgeführt.

Veldkamp und Visser (1975) beschrieben erstmalig einen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), bei dem Sonikatantigen von *T. pallidum*, das adsorptiv an Festphasen gebunden ist, mit spezifischen Antikörpern aus dem Untersuchungsmaterial reagiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt durch Reaktion mit einem enzymmarkierten speziesspezifischen Sekundärantikörper gegen Immunglobuline der Klasse IgG bzw. IgM und nachfolgender enzymatischer Farbreaktion. Auf diesem Prinzip beruht auch der kommerzielle indirekte Enzymimmuntest Captia Syphilis G (Mercia Diagnostics, Guildford, England). Für diesen Test wurde eine Sensitivität von 98,4% und eine Spezifität von 99,3% ermittelt (Young et al. 1989, 1992). Beim Captia Syphilis M wird spezifisches IgM nachgewiesen, das bereits in der Frühphase der Erkrankung gebildet wird (Sensitivität bei Primärsyphilis 82%). Da IgM-Antikör-

per nicht placenta­gängig sind, ist dieser Test bedeutsam für die Diagnostik der konnatalen Syphilis (Sensitivität 100%, Ijsselmuiden et al. 1989). Das Testprinzip beruht auf einem festphasegebundenen Fangantikörper für IgM aus dem Untersuchungsmaterial, wobei spezifische IgM-Antikörper anschließend mit *T. pallidum*-Antigen reagieren. Der Nachweis erfolgt über einen enzymmarkierten monoklonalen Antikörper gegen Endoflagellen durch nachfolgende enzymatische Farbreaktion.

Bei dem Syphilis BioEnza Bead Assay (Organon Technika Corp., USA) ist das *T. pallidum*-Antigen adsorptiv an ferromagnetische Partikel gebunden. Die Bindung von Antikörpern aus dem Untersuchungsmaterial wird dann über enzymmarkierten Sekundärantikörper und Farbreaktion nachgewiesen. Sensitivität und Spezifität werden für diesen Test mit 93% und 98,6% angegeben (Burdash et al., 1987).

Sonikatantigen, wie vorstehend erwähnt, wird durch mechanische Aufarbeitung des Erregers mittels Ultraschall gewonnen.

Die oben schon erwähnte mangelnde in vitro-Kultivierbarkeit von *T. pallidum* führt natürlich dazu, daß diese Erreger nur sehr schwer zur Verfügung gestellt werden können.

Allgemein anerkannt ist derzeit eine zweistufige Diagnostik der Syphilis. In der ersten Stufe werden alle Seren mit einem Test untersucht (Screening). In der zweiten Stufe werden Seren mit positivem Befund mit einem anderen Testsystem untersucht (Bestätigungstest). Da die Prävalenz der Syphilis in vielen Ländern gering ist (< 1%), reicht eine 99%ige Spezifität des Screeningtests nicht zur Diagnosesicherung aus. Ein positiver Vorhersagewert von über 90% wird erst mit einem Bestätigungstest, der auf andersartigem Nachweisprinzip beruht, erreicht.

Weit verbreitet ist die Anwendung von TPHA allein oder in Kombination mit VDRL-Test bzw. RPR-Test im Screening und die Prüfung der positiv gefundenen Seren im FTA-ABS als Bestätigungstest.

Als Therapiekontrolle ist die quantitative Durchführung von VDRL-Test bzw. RPR-Test anerkannt, wobei ein Titerabfall um mehr als 4 Titerstufen als Therapieerfolg gewertet wird.

Bewertung der gegenwärtigen Syphilisdiagnostik: Nicht-Treponemen-spezifische Tests liefern ca. 5% falsch positive Resultate. Sie sind daher für die serologische Diagnostik nur als erster Schritt geeignet und müssen bei positivem Ausfall im zweiten Schritt durch Treponema-pallidum-spezifische Tests ergänzt werden. Da Nicht-Treponemenspezifische Tests bei quantitativer Auswertung eine Korrelation zur Krankheitsaktivität zeigen, können sie zur Erfolgskontrolle antibiotischer Therapie herangezogen werden.

Falsch positive Testergebnisse bei den treponemen-spezifischen Tests sind wegen Antigenverwandtschaft zu Treponemen möglich, die beim Menschen als Kommensalen in der Mundschleimhaut vorkommen. Auf Grund der mangelhaften Spezifität und Sensitivität konnten sich diese Testsysteme zur Diagnostik der Syphilis nicht durchsetzen.

Die *T. pallidum*-spezifischen Tests basieren auf Antigenpräparationen von *T. pallidum*, wobei das verwendete Erregermaterial wegen der mangelnden in vitro-Kultivierbarkeit von *T. pallidum* aus infizierten Kaninchenhoden gewonnen wird. Das ist mit Fragen des Tier­schutzes belastet und nur in geringer Menge möglich. Der FTA-ABS und der Nelson-Test sind in der Durchführung aufwendig und nicht zur Automatisierung ge-

eignet. Da Antikörper gegen nichtpathogene Treponemen auch bei Gesunden vorkommen und infolge Antigenverwandtschaft mit *Treponema pallidum*-Sonikatantigen Kreuzreaktivität zeigen, erfordert die Verwendung von *Treponema pallidum*-Vollantigen eine Serumabsorption mit Präparationen aus *Treponema phagedenis*.

Die ELISA-Systeme auf der Basis von *Treponema pallidum* als Vollantigen erfüllen zwar die Qualitätskriterien in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, sind aus Kostengründen jedoch nicht geeignet, die weitverbreitete Zweistufendiagnostik TPHA, VDRL-Test oder RPR-Test in Kombination mit dem FTA-ABS abzulösen.

In der EP 0 391 330 A2 wird bereits festgestellt, daß die auf dem Markt befindlichen Tests den Anforderungen an Screening-Tests nicht entsprechen, auch hinsichtlich des technischen Aufwandes und der Testbewertung. Dort wird vorgeschlagen, dem dadurch entgegenzuwirken, daß die Antigene an eine Festphase gebunden werden, und zwar entweder irreversibel direkt oder über einen nicht immunchemisch bindenden Spacer.

Aufgabe der Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* vorzuschlagen, das eine Verbesserung dieser Situation erlaubt.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Anspruch 3 gelöst.

Durch ein derartiges Verfahren entsteht erstmals ein hinsichtlich des technischen Aufwandes vertretbares Verfahren, das zugleich im Ergebnis ein erforderliches Höchstmaß an Sensitivität und Spezifität bei der Bestimmung von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* liefert.

Vorschläge zur Klonierung von *Treponema pallidum*-DNA anstelle der mangelnden in vitro-Kultivierbarkeit sind zwar schon gemacht worden, allerdings sind dabei keine kommerziell nutzbaren diagnostischen Systeme entstanden, die die Sensitivität und Spezifität der bisherigen Syphilisdiagnostik erreichen konnten. Bekannt sind daher lediglich Spekulationen aus der Literatur, jedoch keine Berichte über Verfahren zur Serodiagnostik der Syphilis unter Anwendung einer Kombination von rekombinanten Antigenen.

Es stellte sich heraus, daß ein prinzipielles Problem der Serodiagnostik mit Einzelantigenen darin besteht, daß die Höhe der Antikörperspiegel für die einzelnen Antigene sowohl vom Krankheitsstadium abhängt, als auch personenabhängige, individuelle Unterschiede auftreten. Ein kombinierter Antikörpernachweis gegen mehrere diagnostisch relevante Antigene, also eine Auswahl derselben, kann daher die Sensitivität und Spezifität der serologischen Diagnostik steigern.

In den Unteransprüchen sind bevorzugte, erfindungsgemäße Auswahlen angegeben.

Ein weiterer entscheidender Faktor für Testsysteme mit rekombinanten Proteinen ist deren Reinheit. Bei Verwendung von rekombinanten Antigenen aus Expressionssystemen mit *E. coli* ist eine möglichst vollständige Entfernung der Wirtsproteine erforderlich, da sonst natürliche Antikörper gegen dieses Darmbakterium im Testsystem nachgewiesen werden. Die Herstellung der rekombinanten Proteine mit Klonierungsstrategie, Expression und Reinigung der verwendeten rekombinanten Proteine ist deshalb von erheblicher Bedeutung für das jeweilige Testverfahren.

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert auf der Re-

aktion von spezifischen Antikörpern aus Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma oder Liquor, mit rekombinanten Antigenen von *Treponema pallidum*, die an eine feste Phase gebunden sind. Durch spezifische Antigen-Antikörperreaktion gebundene Antikörper werden bevorzugt durch einen sekundären markierten Antikörper nachgewiesen. Dabei sind radioaktive Markierungen, Markierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen möglich. Gemessen wird die gebundene Radioaktivität (Prinzip des Radioimmunoassays), die Fluoreszenz (Fluoreszenzimmunoassay), die Enzymaktivität durch Substratfarbreaktion (colorimetrischer Immunoassay) oder Substratreaktion mit Chemilumineszenz (Chemilumineszenzimmunoassay). Exemplarisch vorgestellt werden Verfahren mit colorimetrischem und mit Chemilumineszenznachweis.

Die Antigene werden durch verschiedene Prinzipien an eine feste Phase gebunden. Mögliche Bindungsprinzipien sind die adsorptive Bindung, kovalente Bindung oder eine Bindung durch Reaktion mit einem bereits festphasegebundenen spezifischen Fangantikörper. Als Trägermaterial können Mikropartikel, Kugeln, Stäbchen, Röhrchen und Mikrotiterplatten oder poröse Materialien verwendet werden. Exemplarisch vorgestellt werden Testsysteme mit Mikrotiterplatten, an die die Antigene adsorptiv gebunden wurden sowie ein Nachweisverfahren mit kovalenter Bindung der Antigene an paramagnetische Partikel.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt zusammen mit einer Auswahl von rekombinanten Antigenen von *Treponema pallidum*. Die Gene für das 17 kD-Antigen, für das 47 kD-Antigen, TmpA, TmpC und BMP, das 34 kD-Antigen und Tp4 wurden aus *Treponemapallidum*-DNA durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert, in den Plasmidvektor pQE30 inseriert und in *E. coli* M15[pREP4] transformiert. Das verwendete Wirts-Vektorsystem erlaubte eine induzierbare Expression der rekombinanten Proteine mit nachfolgender affinitätschromatographischer Reinigung der rekombinanten Proteine, die dann an die feste Phase gebunden wurden.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin das Verfahren zur Auswahl der rekombinanten Antigene mit Eignung für die Serodiagnostik der Syphilis durch Prüfung des Antikörpergehaltes in Patientenseren der verschiedenen Stadien und der kombinierte Nachweis von Antikörpern gegen die in den Ansprüchen 1 und 2 angegebenen Antigene von *Treponema pallidum*.

Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beschrieben:

Klonierung, Expression und Reinigung der *Treponema pallidum*-Antigene

1. Klonierungsstrategie (Abb. 1)

Für ausgewählte Antigene von *T. pallidum* wurde eine Genamplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) an *Treponema pallidum*-DNA durchgeführt. Nach Insertion der PCR-Produkte in den Plasmidvektor pQE-30 (QIAGEN, USA) wurde *E. coli* M15[pREP4] transformiert. In den so erhaltenen Klonen ließ sich die Expression der rekombinanten Antigene gezielt induzieren. Eine affinitätschromatographische Reinigung wurde durch das verwendete Expressionssystem ermöglicht und lieferte die rekombinanten Antigene in ausreichender Reinheit für diagnostische Tests.

2. Vorauswahl starker Immunogene von *T. pallidum*

Im Verlauf der Syphilis werden Antikörper gegen eine Vielzahl von *Treponema pallidum*-Proteinen gebildet (Norris et al., 1993). Zur Identifizierung starker Immunogene wurde ein Westernimmunoblot durchgeführt. Dabei zeigten Patientenseren mit aufgetrenntem *T. pallidum*-Vollantigen starke Reaktivität mit Banden, die dem 15 kD-Antigen, dem 17 kD-Antigen, dem 34 kD-Antigen, den Endoflagellenantigenen (FlaB1, FlaB2, FlaA), dem BMP, dem TmpA und dem 47 kD-Antigen entsprechen (Abb. 2).

Wegen bekannter Antigenverwandtschaft zu homologen Proteinen anderer *Treponemenspecies* wurden Endoflagellenantigene nicht ausgewählt. Die übrigen Antigene wurden kloniert und mit Ausnahme des 15 kD-Antigens exprimiert.

3. Klonierung der *Treponema pallidum*-Antigene

Treponema pallidum wurde aus infizierten Kaninchenhoden gewonnen, und die genomische DNA wurde durch eine modifizierte Proteinase K/SDS-Methode isoliert (Sambrook et al.). Die Genamplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte mit Hilfe spezifischer Primer (Tab. 2), so daß Restriktionsendonukleaseschnittstellen (BamHI am 5'-Ende, SalI am 3'-Ende) den Einbau der PCR-Amplifikate in die entsprechende Klonierungsstelle des Vektors pQE-30 ermöglichen.

Die PCR (Sambrook et al. 1989) wurde in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt und enthielt 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, Desoxyribonukleotid-Mix (je 200 µM für ATP, GTP, TTP, CTP), je 100 pmol Klonierungsprimer 1 und 2 (Tab. 2), 1 ng chromosomale *T. pallidum*-DNA bzw. 20 ng Plasmid-DNA mit inserierter *T. pallidum*-Genesequenz und 1 Einheit Taq-Polymerase (Pharmacia). Der Ansatz wurde mit 100 µl Öl überschichtet (Mineral Oil, SIGMA). Die Reaktionen wurden im Thermocycler (Landgraf) durchgeführt (Denaturierung 60 s, 94°C, Annealing 120 s, 50°C, Polymerisation 120 s, 72°C). Die Größe der PCR-Produkte wurde in der Agarosegelelektrophorese überprüft.

Restriktion und Ligation von Vektoren und PCR-Produkten erfolgten nach Standardprotokoll (Sambrook et al. 1989). Die In-Gel-Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers der niedrigschmelzenden Agarose durchgeführt (Seaplaque GTG, FMC). Beim Einsatz der Restriktionsendonukleasen, der alkalischen Phosphatase und der T4 DNA-Ligase (Pharmacia) wurden die Hinweise des Herstellers berücksichtigt. Für die Reinigung von DNA-Fragmenten wurde das Glass Max System (Gibco BRL) verwendet. Der korrekte Einbau der PCR-Amplifikate wurde durch Molekulargewichtsbestimmung in der Agarosegelelektrophorese und durch DNA-Teilsequenzierung bestätigt.

4. Expression der *Treponema pallidum*-Antigene

Durch die angewendete Klonierungsstrategie unter Verwendung des Plasmidvektors pQE-30 wurden Expressionssysteme für rekombinante *Treponema pallidum*-Antigene erhalten (Tab. 3), die wie folgt charakterisiert sind: Auf ein Promotor-Operator-Element, das aus dem Promotor des Bakteriophagen T5, zwei lac-Operatorsequenzen und einer synthetischen Ribosomen-Bindungsstelle besteht (Stüber et al. 1990), folgen Startco-

don, Sequenzen für 6 aufeinanderfolgende Histidinreste, ein Polylinker zur Insertion proteincodierender Sequenzen sowie ein vektorcodierter Transkriptionsterminator. Bei Verwendung des Expressionsvektors pQE-30 sind die rekombinanten Proteine durch eine N-terminale Hexahistidinsequenz modifiziert. Der Laktoserepressor zur Kontrolle der Genexpression wird auf dem Plasmid pREP4 codiert, das im Wirtstamm M15 in mehreren Kopien vorliegt und über seine Kanamycinresistenz selektiert wird. Als Induktor der Genexpression dient das synthetische Lactosederivat IPTG.

Für die konstruierten Expressionssysteme mit Ausnahme für das 15 kD-Antigen wurde bereits nach einer Stunde eine starke Genexpression nachgewiesen. Für nachfolgende Reinigung wurden Kulturen verwendet, die drei Stunden mit 2 mM IPTG induziert wurden. Durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurde das erwartete Molekulargewicht bestätigt und im Westernblot die Reaktivität der rekombinanten Antigene mit Syphiliserum nachgewiesen (Abb. 3). Für das 47 kD-Antigen, das 17 kD-Antigen, BMP und TmpA ist jeweils eine Bande deutlich erkennbar. Für das 17 kD-Antigen war eine weitere sehr schwache immunoreaktive Bande mit einem Molekulargewicht von 35 kD sichtbar, die auf eine Dimerbildung zurückzuführen sein könnte. Das TmpC zeigte keine und das 34 kD-Antigen nur eine schwache Immunoreaktivität.

5. Reinigung der Treponema pallidum-Antigene

Die sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Aminosäurereste der rekombinanten Fusionsproteine gestatten eine Reinigung nach dem Prinzip der immobilisierten Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Hochuli et al. 1987). Der verwendete Chelat-Ligand NTA (Nitrilotriacetic acid) hat vier Bindungsstellen, welche vier der sechs möglichen Bindungen des komplexbildenden Nickelions besetzen. Der mit Metallionen beladene Chelat-Ligand (Ni-NTA, Hoffmann-La Roche) ist an Sepharose CL-6B immobilisiert. Die übrigen zwei freien Bindungsstellen des Nickelions reagieren mit dem 6xHistidin-Affinitätsende am N-terminalen Ende des rekombinanten Proteins. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch Protonierung der Histidin-Aminosäurereste im sauren pH-Bereich (etwa bei pH 5.8) und Dissoziation vom Ni-NTA-Liganden. Die Reinigung der rekombinanten T. pallidum-Antigene wurde nach dem Protokoll des Herstellers (QIAGEN) aus dem Pellet von 500 ml induzierter Bakterienkultur unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Ausbeute lag zwischen 5 bis 68 mg Protein/l induzierter Kultur. Die densitometrisch bestimmte Reinheit schwankte von 70 bis 99% (Tab 4).

Bindung von T. pallidum-Antigen an eine feste Phase und Nachweis spezifischer Antikörper

1. Beispiel 1: Adsorptive Bindung von rekombinantem T. pallidum-Antigen an Mikrotiterplatten und colorimetrischer Enzymimmunttest (col-EIA)

Mikrotiterplatten mittlerer Bindungskapazität (F-Form, G reiner) wurden 18 Stunden bei 4°C mit 100 µl Antigen in 0,1 M Bicarbonatpuffer beladen (0,04 M Na₂CO₃, 0,06 M NaHCO₃, pH 9.6). Die Antigenkonzentration betrug 1 µg/ml. Die beladenen Platten wurden dreimal mit 200 µl Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween 20) gespült, um nicht gebundenes Antigen zu entfernen.

Anschließend wurde eine einstündige Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte mit 5%igem Magermilchpulver in Waschpuffer durchgeführt, der sich ein dreifacher Waschkvorgang anschloß. Danach wurde bei Raumtemperatur eine zweistündige Inkubation mit 100 µl Patientenserum in Waschpuffer in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 200 µl Waschpuffer. Ein Anti-human-IgG-AP-Konjugat (γ-kettenspezifisch) wurde nach Angaben des Herstellers (SIGMA) in Waschpuffer verdünnt. Jeweils 100 µl Konjugat wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 200 µl des Enzymsubstrates p-Nitrophenylphosphat in 0,2 M Tris (p-NPP-Substrattablenset, SIGMA) zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 N NaOH abgestoppt. Die Extinktion wurde gegen den Substrat-Blank bei einer Wellenlänge von 405 nm im Mikrotiterplattenphotometer Anthos gemessen.

Zur Testoptimierung wurden Schachbrettiterationen durchgeführt und als Standardbedingungen eine Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1 : 4000 und des Untersuchungsserums von 1 : 400 ausgewählt (Abb. 4 und 5). Bei höheren Verdünnungen war eine Verringerung des Quotienten aus Extinktionen eines Sekundärsyphilispoolserums und einem Negativserum (P/N-Quotient) zu verzeichnen. Für das 17 kD-Antigen, das 47 kD-Antigen und das TmpA wurden die höchsten P/N-Quotienten ermittelt. Deshalb wurden diese drei Antigene für einen kombinierten ELISA ausgewählt.

2. Beispiel 2: Adsorptive Bindung von rekombinantem T. pallidum-Antigen an Mikrotiterplatten und Chemilumineszenz-Enzymimmunttest (CL-EIA)

Auf der Basis des ELISA-Light Kit (Tropix Inc., USA), dessen Detektionssystem auf der Chemilumineszenz bei enzymatischer Umsetzung von Dioctetanen (EP-B-0275260) beruht, wurde folgendes Protokoll entwickelt:

Mikrotiterplatten (Mikrolite®, Dynatech USA) wurden unter den in Beispiel 1 genannten Bedingungen beladen (Antigenlösung 1 µg/ml in Bicarbonatpuffer) und nach 18stündiger Inkubation bei 4°C dreimal gewaschen. (PBS, 0,05% Tween 20). Nach einstündiger Blockierung (PBS, 0,5% I-Block [Tropix Inc.], 0,05% Tween 20) wurde viermal mit Waschpuffer gespült (0,2% I-Block, 0,05% Tween 20 in PBS). Die nachfolgende Inkubation mit in Waschpuffer verdünnten Patientenserum erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde. Nach drei Waschschriffen schloß sich eine einstündige Inkubation mit 1 : 2500 in Waschpuffer verdünntem Anti-human-IgG-AP-Konjugat (γ-kettenspezifisch, SIGMA) an. Anschließend wurde dreimal in Waschpuffer und zweimal in Assaypuffer (0,1 M Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, pH 10.0) gewaschen. Danach wurde für 10 Minuten mit 100 µl Verstärker/Substrat inkubiert (Assaypuffer, 10% Sapphire, 0,2 mM CSPD, [beides Tropix Inc.]). Die Chemilumineszenz wurde nach 20 Minuten im Mikrotiterplattenluminometer Lucy1 (Anthos) gemessen.

Zur Testoptimierung wurden Schachbrettiterationen durchgeführt und als Standardbedingungen eine Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1 : 2500 und des Untersuchungsserums von 1 : 800 ausgewählt.

Die Abhängigkeit des Chemilumineszenzsignals von der Antikörperkonzentration gegen die einzelnen Anti-

gene (geprüft an Verdünnungen des Sekundärsyphilispoolserums, Abb. 6) war über 6 Titerstufen nahezu linear. Die entsprechenden Kurven sind als Referenzkurven zur quantitativen Bestimmung von Antikörperkonzentrationen in unbekannten Untersuchungsproben sehr gut geeignet. Der große lineare Bereich zeigt die Überlegenheit des Chemilumineszenz-EIAs für quantitative Antikörperbestimmungen gegenüber dem colorimetrischen Nachweis. Die Chemilumineszenztests mit Tp4, TmpC sind jedoch nicht zum Einsatz in der serologischen Syphilisdiagnostik geeignet, da die Antikörperkonzentrationen gemessenen an der Höhe der Chemilumineszenz wie auch die P/N-Quotienten (1,5; 2,2) zu niedrig sind. Wegen des vergleichsweise niedrigen P/N-Quotienten von 6,7 ist das 34 kD-Antigen weniger zum diagnostischen Einsatz geeignet. Für das 17 kD-Ag, TmpA, das 47 kD-Antigen und BMP wurden im entsprechenden Chemilumineszenz-EIA die höchsten Chemilumineszenzwerte gemessen. Die P/N-Quotienten lagen bei 94 für das 17 kD-Ag, 35 für das TmpA, 11 für das 47 kD-Ag und 14 für BMP (Serumverdünnung 1 : 800, Abb. 7). Mit dem 17 kD CL-EIA, dem TmpA CL-EIA, dem 47 kD-Ag CL-EIA und dem E3MP CL-EIA wurden Seren von Patienten der verschiedenen Syphilisstadien untersucht. Die Chemilumineszenzwerte wurden dabei auf ein Vielfaches eines mitgeführten negativen Serum-pools umgerechnet. Zur qualitativen Auswertung der Tests wurden als Grenzwert die dreifache Standardabweichung vom Blutspendermittelwert ($n = 38$) festgelegt (Abb. 8). Die Ergebnisse im Chemilumineszenz-EIA sind in Tabelle 5 zusammen mit den Ergebnissen im colorimetrischen Test den Ergebnissen im CMT, dem TPHA-Test und dem FTA-Abs-Test gegenübergestellt. Insgesamt ist eine Befundkorrelation in der Weise vorhanden, daß für Seren mit niedrigem Titer in CMT, TPHA oder FTA-Abs auch niedrige Antikörperkonzentrationen in den Enzymimmuntests nachgewiesen wurden. Dies ist besonders deutlich für Seren des latenten Syphilisstadiums. Im BMP CL-EIA lagen 8 von 18 Seren unterhalb des Grenzwertes, darunter alle untersuchten Seren im latenten Stadium der Syphilis. Für ein serologisches Syphilisscreening ist der isolierte Nachweis von Antikörpern gegen BMP nach den bisher vorliegenden Ergebnissen nicht geeignet. Die hier vorgestellten Erstbefunde lassen jedoch auf eine mögliche Korrelation der Antikörperkonzentrationen zum Krankheitsstadium und/oder der Krankheitsaktivität schließen. Sollte sich dies nach Untersuchung einer größeren Anzahl von Syphilispatienten bestätigen, könnte ein Antikörpernachweis gegen BMP z. B. als Therapie-kontrolle diagnostisch verwertbar sein. Unter den 18 untersuchten Syphilisseren waren in den CL-EIAs mit dem 17 kD-Antigen und dem 47 kD-Antigen je zwei und mit TmpA drei Seren negativ. Davon war ein Serum in allen drei Tests negativ, die anderen negativen Befunde in einem Test mit rekombinantem Antigen waren mit positiven Befunden für die anderen rekombinanten Antigene verbunden. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß eine ausreichende diagnostische Sicherheit nur durch Antikörperbestimmung gegen mehrere re-kombinante Antigene zu erreichen ist.

3. Beispiel 3: Kovalente Bindung von rekombinantem *T. pallidum*-Antigen und Chemilumineszenz-Enzymimmuntest

Zur kovalenten Bindung von rekombinanten *Trepoma pallidum*-Antigenen an eine feste Phase wurden

superparamagnetische Polystyrol-Partikel (DYNABE-ADS M-280 Tosylactivated, DYNAL Norwegen) verwendet. Das Prinzip der kovalenten Bindung ist in den technischen Unterlagen ausreichend beschrieben. Weiterer wesentlicher Bestandteil dieses Verfahrens ist das Prinzip der Separation der Partikel von den jeweiligen Reaktionslösungen durch ein Magnetfeld. Im vorliegenden Beispiel wurden Eppendorfröhrchen mit den Magnetpartikeln in Reaktionslösung zur Phasentrennung in einen Magnetseparator gebracht. Dabei werden die superparamagnetischen Partikel durch das Magnetfeld eines Permanentmagneten an die Wandung gezogen und die Reaktionslösung kann durch Abpipettieren oder Absaugen entfernt werden.

Der Versuch wurde exemplarisch mit dem rekombinanten 17 kD-Antigen durchgeführt. Die Partikel wurden im Magnetseparator vom Transportmedium getrennt, zu 20 mg/ml resuspendiert, mit gleichem Volumen von rekombinantem Protein versetzt und 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionsbedingungen bei der dabei erfolgenden Bindung des rekombinanten Proteins an die Partikel waren 10 mg/ml Partikel, 20 µg/ml rekombinantes Protein in 0,05 M Boratpuffer pH 9,5. Anschließend wurde mit Waschpuffer (PBS, 0,2% I-Block, 0,05% Tween 20) dreimal 10 min, einmal 30 min und einmal über Nacht gewaschen, wobei simultan freie Proteinbindungsstellen blockiert wurden. Die beladenen Partikel wurden bei 4°C aufbewahrt und am Tag des Tests zweimal mit Waschpuffer gewaschen und für die Versuchsansätze portioniert. Für einen Test wurden 0,05 mg Partikel mit 100 µl Patientenserum in einer Verdünnung von 1 : 800 in Waschpuffer über eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde mit Sekundäntikörper (1 : 2500 Anti-Human-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, γ -kettenspezifisch, SIGMA) über 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde zweimal in Waschpuffer und zweimal in Diethanolaminpuffer (0,1 M Diethanolamin, 1 mM $MgCl_2$, 0,02 NaN_3 , pH 10,0) gewaschen. Nach Resuspendieren der Partikel in 50 µl Diethanolaminpuffer wurden diese in Mikrotiterplatten überführt, die je Kavität 50 µl Verstärker/Substratlösung enthielten. (Endkonzentrationen in 100 µl: 10% Sapphire, 0,2 mM CSPD, [beides Tropix Inc.]). Die unter Vermittlung der alkalischen Phosphatase entstehende Chemilumineszenz bei der Umsetzung des Substrates wurde im Mikrotiterplattenluminometer Lucy1® (Anthos) gemessen. Für das rekombinante 17 kD-Antigen wurden in diesem System ein Poolserum von 73 Blutspendern mit einem Poolserum von Patienten mit Sekundärsyphilis verglichen. Bei einer Integrationszeit von 1 s je Chemilumineszenzmessung wurden als relative Counts für das Syphilispoolserum 1.481.958,5 (10 min nach Reaktionsbeginn), 1.641.317,5 (nach 20 min) bzw. 1.746.169 (nach 30 min) sowie für das Blutspenderpoolserum 7519,5 (nach 10 min), 9929,5 (nach 20 min) bzw. 11629 (nach 30 min) ermittelt. Dies entspricht einem Positiv/Negativ-Quotienten nach einer Substratinkubation von 10 min von 197, nach 20 min von 165 und nach 30 min von 150. Aus diesen Werten ist ersichtlich, daß offenbar eine geringere unspezifische Bindung von Antikörpern an die feste Phase erfolgt. Dadurch ist die analytische Sensitivität den unter Beispiel 1 und Beispiel 2 vorgestellten Systemen überlegen.

4. Simultaner Einsatz rekombinanter Antigene in der serologischen Diagnostik

Bei der Serodiagnostik von Infektionskrankheiten ist

bei Nachweis verschiedener Antikörperspezifitäten gegen den Erreger prinzipiell eine Verbesserung der Sensitivität gegenüber dem Nachweis von Antikörpern gegen ein einzelnes Antigen möglich. Aus diesem Grund wird z. B. als Bestätigungstest bei der serologischen HIV-Diagnostik ein Westernimmunoblot angewendet. Dabei reagieren Antikörper aus Untersuchungsmaterial mit Erregermaterial, dessen Antigene durch eine Elektrophorese aufgetrennt und auf eine feste Phase überführt wurden. Als sicher positiv gilt der Test, wenn mehrere erregerspezifische Banden reaktiv sind. Zwingend wird der Nachweis von verschiedenen Antikörperspezifitäten zur Diagnosestellung dann, wenn der Antikörpernachweis gegen Einzelantigene nicht bei allen Kranken gelingt.

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein Mischantigen-ELISA vorgestellt, der bei zu geringer Reaktivität des Serums gegen ein oder mehrere Antigene durch Nachweis von Antikörpern gegen die anderen Antigene einen positiven Testausfall ergibt. Bei der Untersuchung von Syphilispatienten mit den rekombinanten Antigenen im colorimetrischen System (Beispiel 1), wie auch mit dem Chemilumineszenztest (Beispiel 2) zeigte es sich, daß einzelne Seren im Einzelantigen-ELISA negativ reagieren (Tabelle 5). Ein Serum wies negative Testergebnisse in den Enzymimmuntests mit TmpA, BMP, 47 kD-Antigen und 17 kD-Antigen sowohl im colorimetrischen Nachweissystem als auch im Chemilumineszenznachweis auf. Eine Erklärung gibt der Westernblot mit *Treponema pallidum*-Vollantigen, der nur für Tp4 deutliche Reaktivität zeigte. Stark positiv war für dieses Serum auch ein Chemilumineszenz-ELISA mit rekombinantem Tp4. Da immunologische Kreuzreaktivität des Tp4 zu Hsp60-Proteinen anderer Bakterienspezies ist, besitzt ein isolierter Antikörpernachweis gegen Tp4 geringen diagnostischen Wert und könnte auch auf eine andere Infektion zurückzuführen sein. Die übrigen Seren mit negativem Testergebnis in einem Einzelantigen-ELISA wiesen jedoch positive Tests mit den anderen getesteten rekombinanten Antigenen auf. Der Mischantigen-ELISA war in diesen Fällen positiv. Dies beweist die Überlegenheit eines Mischantigen-ELISAs mit rekombinanten Antigenen gegenüber Einzelantigen-ELISAs für einen qualitativen Nachweis der Syphilisinfektion. Die kombinierte Anwendung rekombinanter Antigene zum Nachweis einer Syphilisinfektion stellt damit einen wesentlichen Bestandteil der vorliegenden Erfindung dar.

Im Einzelantigen-ELISA lagen die gemessenen Counts für hochpositive Seren auf etwa demselben Niveau (Abb. 9), so daß die simultane Beladung der Mikrotiterplatten mit den Antigenen mit gleichen Konzentrationen erfolgte. Bei einem Test zum simultanen Nachweis von Antikörpern gegen mehrere rekombinante Antigene kommt es darauf an, daß jedes einen meßbaren Anteil am Gesamtsignal hervorruft. Die Effizienz der Bindung der rekombinanten Antigene an die Festphase kann jedoch unterschiedlich sein. Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion mit mehreren Antigenen, die am gleichen Träger gebunden sind, könnten kompetitive Effekte ebenfalls eine Rolle spielen. Deshalb wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem rekombinantes Antigen dem Patientenserum zugesetzt wurde. Dadurch reagieren die entsprechenden Antikörper mit dem rekombinanten Antigen in Lösung und nicht mit dem festphasengebundenen. Die Effizienz dieser kompetitiven Hemmung wurde für jede Antikörperspezifität im Einzelantigen-ELISA ermittelt und lag zwischen 91 und 99%

(Tab. 6). Auf Grund dieses hohen Prozentsatzes konnte im Mischantigen-ELISA der gemessene Hemmeffekt näherungsweise zur Abschätzung des CL-Anteils für die AK-Bindung am einzelnen Antigen dienen. Für ein Poolserum von Patienten mit Sekundärsyphilis wurde so im Mischantigen-ELISA (Beladungskonzentration je 1 µg/ml) der Chemilumineszenzanteil durch Antikörper gegen das 17 kD-Antigen zu 52%, TmpA-Antikörper zu 43% und Antikörper gegen das 47 kD-Ag zu 5% näherungsweise ermittelt. Der Antikörpernachweis gegen das 47 kD-Antigen erscheint unterrepräsentiert. Da es sich bei dem 47 kD-Antigen um ein spezifisches Antigen von *Treponema pallidum* mit starker Immunogenität handelt, sollte der gewünschte Anteil am Gesamtsignal durch Veränderung der Konzentrationsverhältnisse der rekombinanten Antigene beim Beladen verändert und wie beschrieben geprüft werden.

Eine elegante Methode für den simultanen Nachweis der Antikörperspezifitäten stellt die Verwendung von Mikropartikeln dar. Jedes einzelne rekombinante Antigen wird in separatem Ansatz an die Mikropartikel gebunden und im Test mit Einzelantiseren die Chemilumineszenzwerte ermittelt. Mit den erhaltenen Werten läßt sich ein optimales Mischungsverhältnis der Mikropartikelpräparationen ermitteln, so daß für die größtmögliche Zahl der Syphilispatienten ein Meßergebnis über dem Grenzwert erzielt wird. Wenn Mikropartikel separat mit Antigen beladen und erst nachträglich gemischt werden, sind kompetitive Hemmeffekte sowohl bei der Antigenbindung an die Festphase als auch bei der Antigen-Antikörperreaktion ausgeschlossen. Die Funktionsfähigkeit und Überlegenheit dieses Verfahrens ist durch die im Beispiel 2, Beispiel 3 und dem Mischantigen-ELISA (Mikrotiterplattenverfahren) hinreichend nachgewiesen. Das beschriebene Verfahren ist geeignet zur Bindung von Antigenen, Antigenbestandteilen oder auch von Peptiden mit ausgewählten Antigeneterminanten an Mikropartikel, Bestimmung von deren diagnostischer Relevanz und deren kombinierte Einsatz für einen qualitativen Test in der Serodiagnostik der Syphilis. Auch in der Diagnostik anderer Infektionskrankheiten ist dieses Verfahren durch entsprechende Evaluierung der diagnostisch relevanten Antigene des betreffenden Erregers möglich.

Das Verfahren, bei dem verschiedene diagnostisch rekombinante Antigene separat an Mikropartikel als feste Phase gebunden in Testsystemen nach diagnostischen Kriterien evaluiert werden, und bei dem dann diese Mikropartikel in einem optimalen Mischungsverhältnis in einem qualitativen serologischen Test eingesetzt werden, ist von besonderem Vorteil.

Die Erfindung betrifft ein immunochemisches Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Blutserum und anderen Körperflüssigkeiten. Das beschriebene Nachweisverfahren beruht auf dem quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante, in den Ansprüchen 1 und 2 angegebene Antigene von *Treponema pallidum*, wobei der Nachweis für jedes einzelne Antigen oder deren Kombinationen geführt wird. Das vorgestellte Verfahren erlaubt einen Vergleich der Prävalenz und der Titer von Antikörpern gegen jedes *Treponema pallidum*-Antigen bei Syphilispatienten gegenüber nichtinfizierten Patienten. Daraus lassen sich Schlüsse zur diagnostischen Relevanz des Antikörpernachweises gegen jedes untersuchte Antigen ziehen. Antikörpertiter für jedes einzelne Antigen hängen vom Krankheitsstadium ab- und weisen individuelle Unterschiede auf.

Es wird beschrieben, wie durch kombinierten Einsatz von mehreren rekombinanten Antigenen in einem Testverfahren eine verbesserte diagnostische Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann. Das Verfahren des gezielten kombinierten Antikörpernachweises gegen ausgewählte Antigene zur Serodiagnostik der Syphilis ist Bestandteil dieser Erfindung. Entsprechende Testsysteme werden beschrieben. Die Anwendung der beschriebenen Verfahren führt zu einer neuen Generation von Testsystemen zum serologischen Nachweis von Syphilisinfektionen auf der Basis rekombinanter Antigene von *Treponema pallidum*.

Patentansprüche

1. Mittel aus rekombinanten Antigenen zur Durchführung eines Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum*, bestehend aus 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen und TmpA.
2. Mittel nach Anspruch 1, zusätzlich aufweisend TmpC und BMP und das 34 kD-Antigen und Tp4.
3. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum*, bei dem eine Auswahl von rekombinanten Antigenen genamplifiziert und kloniert wird, wobei die Auswahl der rekombinanten Antigene zum Nachweisen von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* das 17 kD-Antigen, das 47 kD-Antigen und TmpA enthält, anschließend diese genamplifizierten und klonierten Antigene in Wirtsvektorsystemen exprimiert und dann gereinigt werden, danach die gereinigten Antigene einzeln oder in Kombination an eine feste Phase gebunden werden, danach die an die feste Phase gebundenen Antigene einer Reaktion mit einem auf Antikörper hin zu untersuchenden Material ausgesetzt werden, und danach die mittels Antigen-Antikörperreaktion gebundenen Antikörper aus dem zu untersuchenden Material mittels eines Detektionssystems qualitativ und/oder quantitativ festgestellt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Auswahl zusätzlich enthält TmpC und BMP und das 34 kD-Antigen und Tp4.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die codierende DNA für die Auswahl der rekombinanten Antigene durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die amplifizierte DNA in den Plasmidvektor pQE-30 inseriert und in *E. coli* M15[pREP4] exprimiert wird.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinanten Antigene affinitätschromatographisch gereinigt werden.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der rekombinanten, gereinigten Antigene an die feste Phase durch adsorptive oder kovalente Bindung oder über einen bereits festphasegebundenen Liganden erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das zu untersuchende Material Körperflüssigkeit insbesondere Blutserum, Liquor, Ascites oder Amnionflüssigkeit ist.

10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der reagierenden Antikörper sekundäre markierte Antikörper eingesetzt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die sekundären markierten Antikörper durch Fluoreszenzfarbstoff, Radioaktivität und/oder Enzyme markiert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung des Sekundärantikörpers direkt oder indirekt über gebundene Liganden erfolgt.

13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis in dem Detektionssystem colorimetrisch und/oder durch Messung der auftretenden Chemilumineszenz und/oder durch Fluoreszenz und/oder Radioaktivitätsmessung erfolgt.

14. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Bindung der rekombinanten, gereinigten Antigene an die feste Phase mehrere rekombinante Antigene gleichzeitig an die feste Phase gebunden werden.

15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Bindung der gereinigten rekombinanten Antigene an die feste Phase die Bindung jedes rekombinanten Antigens separat an einer festen Phase erfolgt und die unterschiedlich beladenen festen Phasen dann im Test gemeinsam eingesetzt werden.

Hierzu 16 Seite(n) Zeichnungen

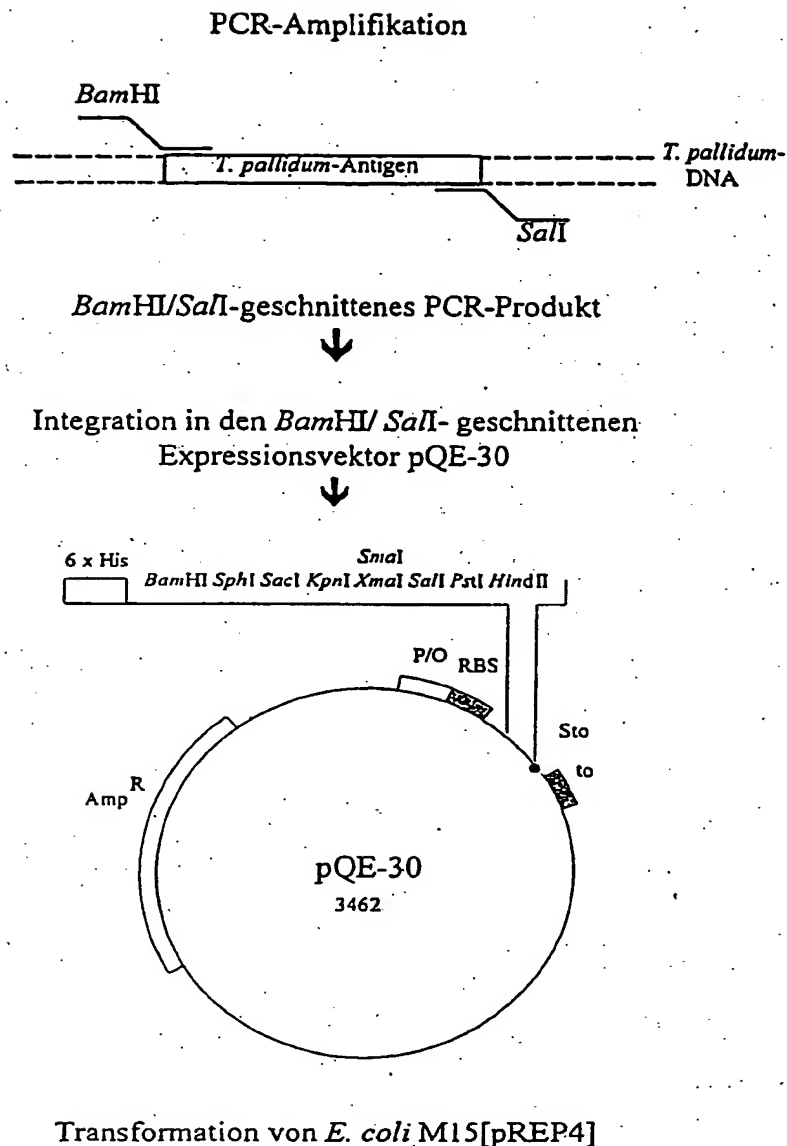


Abb. 1:
Strategie zur Klonierung von *Treponema pallidum*-Antigenen in *E. coli*.

Tabelle 1

Anwendung rekombinanter Antigene (rAg) in Enzymimmunoassays zur serologischen Syphilisdiagnostik
 Zusammenstellung rekombinanter Antigene, die bezüglich ihrer Anwendbarkeit in der Serodiagnostik der Syphilis getestet wurden.
 Angabe des Verhältnisses reaktiver Seren zur Anzahl der untersuchten Seren, im Test eingesetzte Serumverdünnung (SV) sowie ausgewählte Parameter der Testdurchführung.

rAg (nach Norris et al. 1993)	Synonyme Bezeich- nungen	Autor	Test	Bemerkung	Primär- stadium	Sekundär- stadium	Latenz- stadium	Normal- seren	Biologisch falsch positive Seren
TpN44,5	TnpA	Ijsselmuiden et al. 1989b	ELISA	Ag-Beladungs- konzentration 1 µg/ml, SV 1:100	42/55 (76 %)	39/39 (100 %)	53/54 (98 %)	4/938 (0,4 %)	0/68 (0 %)
		Schouls et al. 1989a	ELISA	Ag-Beladungs- konzentration 0,75 µg/ml SV 1:100	21/24 (88 %)	25/25 (100 %)	19/19 (100 %)	0/30 (0 %)	
		Stienstra et al. 1992	ELISA, Eurodiagnostics Apeldoorn, Niederlande	Blutspender- screening, SV 1:20				1/3379 (0,03 %)	
TpN36	TnpB	Schouls et al. 1989a	ELISA	Ag-Beladungs- konzentration 1 µg/ml, SV 1:100	18/24 (75 %)	22/25 (88 %)	12/19 (63 %)	3/30 (10 %)	
TpN35	TnpC	Schouls et al. 1991	ELISA	Ag-Beladungs- konzentration 1 µg/ml, SV 1:100	11/24 (46 %)	25/25 (100 %)	14/19 (75 %)		

rAG (nach Norris et al. 1993)	Synonyme Bezeich- nungen	Autor	Test	Bemerkung	Primär- stadium	Sekundär- stadium	Latenz- stadium	Normal- seren	Biologisch falsch positive Serum
TpN38	37 kD Ag	Rodgers et al. 1986	RIA	Ag-Beladungs- konzentration 13 µg/ml SV 1:25	38/50 (76 %)	71/81 (88 %)		3/65 (4,6 %)	4/42 (9,5 %)
					22/27 (81 %)	19/19 (100 %)	32/33 (97 %)	0/172 (0 %)	0/20 (0 %)
TpN19	4D, TpFI	Radolf et al. 1986	ELISA	Ag-Beladungs- konzentration 3 µg/ml SV 1:10					
		Coates et al. 1986	RIA	Ag-Beladungs- konzentration 50 ng/ml SV 1:100 SV 1:25	10/11 (91 %) 67/121 (55 %)	15/15 (100 %)	12/13 (96 %)	13/130 (10 %)	1/18 (5,6 %)
TpN47	47 kD Ag, P6	Peterson 1986	Dot blot	Phagenlysat, mit rekombinantem TpN47	6/6 (100 %)	10/10 (100 %)	12/12 (100 %)	0/10 (0 %)	
		Weigel et al. 1992	Immunoblot	nicht acyliertes rAg ohne Signalpeptid, SV 1:100	27/29 (93 %)	36/36 (100 %)	51/51 (100 %)		

Tabelle 2

Klonierungsprimer für die Genamplifizierung der *Treponema pallidum*-Antigene

fett

Kursiv

unterstrichen

Schnittstelle der Restriktionsendonuklease

Erste, vom PCR-Amplifikat codierte Aminosäure (TGT und TGC = Cystein; CAG = Alanin; AAG = Lysin)

Stopcodon

(Klonierungs- primer 1. 5'→3' 2. 3'→5')	Gen	Primersequenz 1. 5'→3' 2. 3'→5' (komplementär und invertiert)	Schnitt- stelle	Bemerkung (Leadersequenz kodiert für Signalpeptid)
1. 17 kD Bam	<i>tpn17</i>	ATA ATA GGA TCC TGT GTC TCG TCG ACA ACC GTG	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. 17 kD Sal	"	AGA GAC GTC GAC CTA TTT CTT TGT TTT TTT GAG	SalI	
1. TmpC Bam	<i>tmpC</i>	TAT TAT GGA TCC TGC TCT AAG AGC GAC AGG CC	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. TmpC Sal	"	AGA GAC GTC GAC TTA GTT CAT CAT GCG TGC AGA	SalI	
1. TmpA Bam	<i>tmpA</i>	TAA TAT GGA TCC TGT GCC TCG GGC GCC AAG GAG	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. TmpA Sal	"	ATG ATA GTC GAC TCA TCG AGA GGC TCC TTC TTC	SalI	
1. BMP Bam	<i>bmp</i>	TAT TAT GGA TCC CAG TCG GCG CTG CAG CCT ATC	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. BMP Sal	"	TAT TAT GTC GAC TCA CCA GTC GAG CAC CTT GCC	SalI	
1. 47 kD Bam	<i>tpn47</i>	TAA GAC GGA TCC TGT GGC TCG TCT CAT CAT GAG	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. 47 kD Sal	"	TAT TAG GTC GAC CTA CTG GGA CAC TAC CTT CGC	SalI	
1. 34 kD Bam	<i>tpn29-35</i>	TTA TCT GGA TCC TGC GGG GGC GGT GGA GAG CAT CAG	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. 34 kD Bgl	"	CGG CTA AGA TCT CTA CCA CTG AGG CCC CTT CCA TTC	BglII	
1. 34 kD Bam FL	"	TA CAT GGA TCC AAG AGG GTG AGT TTG CTC GGG AG	BamHI	1. mit Leadersequenz
1. 15 kD Bam	<i>tpN15</i>	ACCACAGGATCCTGTTTCATTTAGTTCATATCCCG	BamHI	1. ohne Leadersequenz
2. 15 kD Sal	"	GAGCGAGTCGACCTACCTGCTAATAATGGCTTCCTT	SalI	
1. Tp4 Bam	<i>tpN60</i>	CACAGCGGATCCGCGAAGCAATTGCTGTTTAAT	BamHI	
2. Tp4 Sal	"	GAGAGTCTCGACTCAATACATACCTCCCATACC	SalI	

Tabelle 3
Klonierungsstrategien für das 17 kD-Antigen, das 47 kD-Antigen, BMP, TmpA und TmpC, Tp4, das 15 kD-Antigen und das 34 kD-Antigen.
 (AS=Aminosäuren)

Bezeichnung nach Norris (1993)	TpN29-35	TpN17	TpN39	TpN44,5	TpN35	Tp4	TpN15	TpN47
Synonyme	34 kD-Antigen, TpD	17 kD-Antigen	BMP	TmpA	TmpC	common antigen	15 kD-Antigen	47 kD-Antigen
Bezeichnung								
Codierende Sequenz	612 bp	471 bp	1086 bp	1038 bp	1062 bp	1635 bp	423 bp	1305 bp
Leadersequenz	57 bp (19 AS)	63 bp (21 AS)	60 bp (20 AS)	63 bp (21 AS)	60 bp (20 AS)	keine	51 bp (17 AS)	60 bp (20 AS)
Reifes Protein	555 bp (185 AS)	405 bp (135 AS)	1023 bp (341 AS)	972 bp (324 AS)	999 bp (333 AS)	entfällt	372 bp (124 AS)	1242 bp (414 AS)
Signalpeptid- erkenntnis- sequenz	Phe-Ala-Gly-Cys	Ser-Ala-Leu-Cys	Ala-His-Ala	Leu-Gly-Ser-Cys	Leu-Ile-Gly-Cys	keine	Leu-Gly-Ala-Cys	Val-Val-Gly-Cys
Klonierungs- strategie	1. erste vom PCR-Produkt codierte AS: Met Klonierung in pUC18 Subklonierung in pTrc99A 2. erste vom PCR-Produkt codierte AS: Cys Klonierung in pUC18 Subklonierung in pQE-30	erste vom PCR-Produkte codierte AS: Cys Direktklonierung in pQE-30 (In-Gel-Ligation)	erste vom PCR-Produkt codierte AS: Gln Klonierung in pUC18 Subklonierung in pQE-30 (In-Gel-Ligation)	erste vom PCR-Produkt codierte AS: Cys Direktklonierung in pQE-30	erste vom PCR-Produkt codierte AS: Cys Direktklonierung in pQE-30	erste vom PCR-Produkt codierte AS: Ala Direktklonierung in pQE-30	erste vom PCR-Produkt codierte AS: Cys Klonierung in pUC18 Subklonierung in pQE-30	erste vom PCR-Produkt codierte AS: Cys Direktklonierung in pQE-30

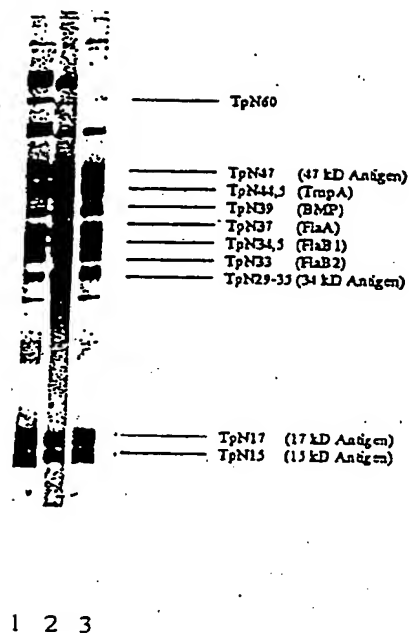


Abb. 2.:

Antigenprofil von *Treponema pallidum* im Immunoblot mit Patientenseren.
 Vollantigen von *Treponema pallidum* wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Immunoreaktivität der Proteinbanden mit Patientenseren im Westernblot untersucht;

- 1: Poolserum von Patienten mit Sekundärsyphilis,
- 2: Individualserum Primärsyphilis
- 3: Individualserum Sekundärsyphilis.

Die Kennzeichnung der Proteinbanden erfolgte mit den Konsensusmolekulargewichten nach der von Norris et al. eingeführten Nomenklatur (1993). Bei den Angaben in Klammern handelt es sich um die vorwiegend in der älteren Literatur verwendeten Bezeichnungen.

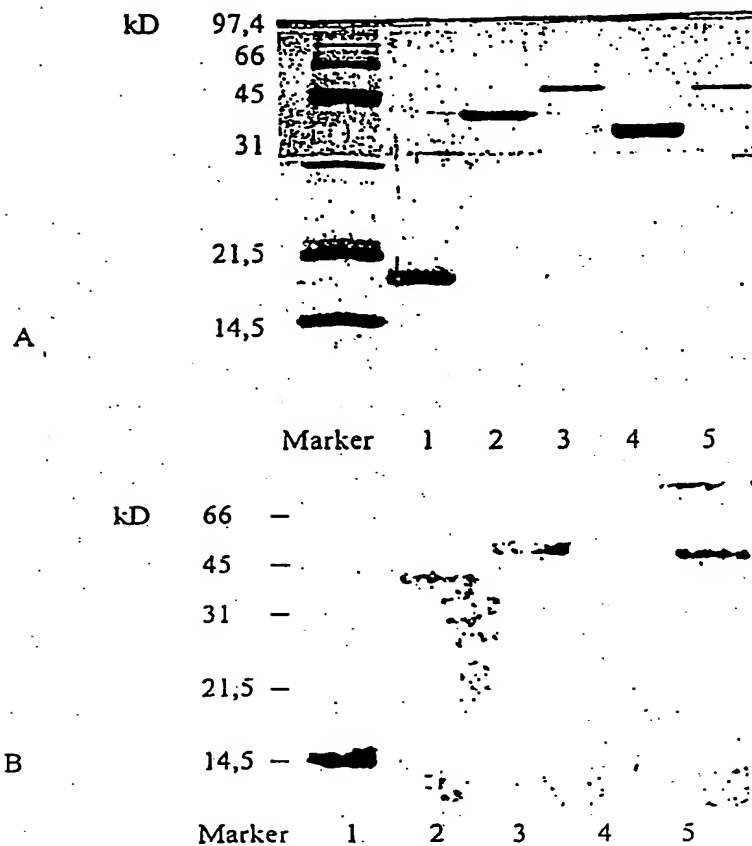


Abb. 3:

Expression und Immunoreaktivität der Fusionsproteine 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen, BMP, TmpA, TmpC.

Bakterien des Stammes M15 mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden wurden angezüchtet und die Genexpression durch Zugabe von 2 mM IPTG in der logarithmischen Wachstumsphase induziert. Nach dreistündiger Weiterinkubation wurden die Zellen geerntet, die Fusionsproteine über Ni-NTA-Sepharose isoliert und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

Für alle Fusionsproteine konnte im Coomassie-gefärbten Gel jeweils eine distinkte Proteinbande sichtbar gemacht werden.

Der Westernblot zeigte die Immunoreaktivität der rekombinanten Proteine BMP, TmpA, 47 kD-Antigen und 17 kD-Antigen. Für das TmpC konnte keine Immunoreaktivität detektiert werden.

A Coomassie-gefärbtes Gel

B Westernblot

- 1 17 kD-Antigen
- 2 BMP
- 3 47 kD-Antigen
- 4 TmpC
- 5 TmpA

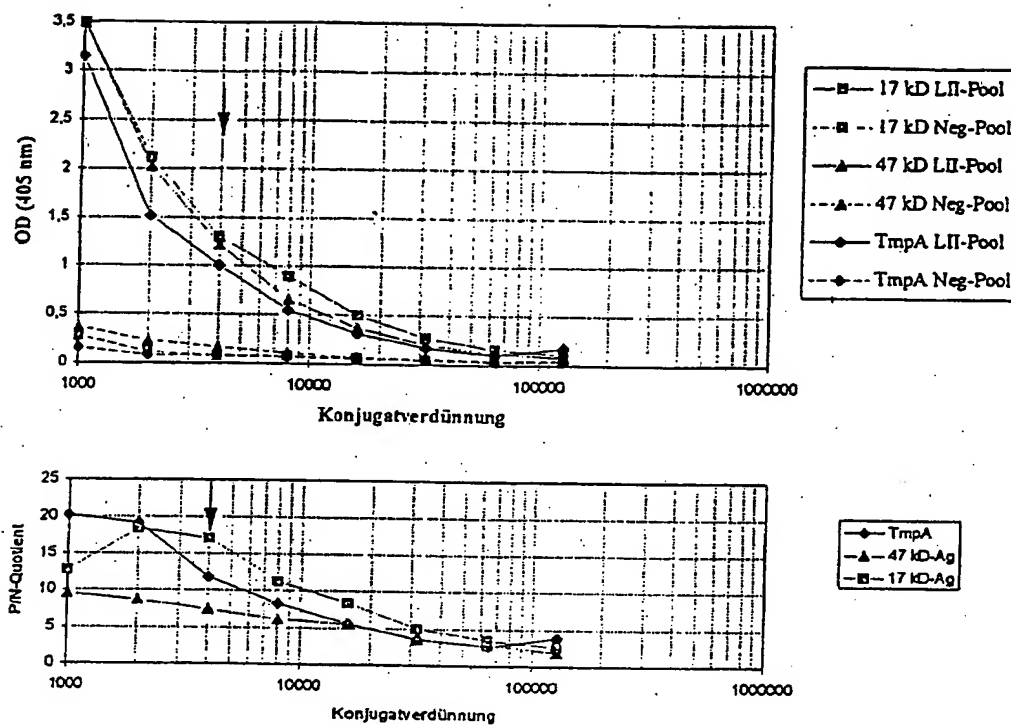


Abb. 4:

Ermittlung der optimalen Konjugatverdünnung für die colorimetrischen Enzymimmuntests mit dem 17 kD-Ag, dem 47 kD-Antigen und TmpA. Extinktion im EIA bei Verwendung der rekombinanten Einzelantigene in Abhängigkeit von der Konjugatverdünnung bei einer konstanten Serumverdünnung des negativen (Neg.-Pool) und positiven Sekundärsyphilispoolserums (LII-Pool) von 1:400. Bei einer Konjugatverdünnung von 1:4000 wurden für das 17 kD-Antigen, das 47 kD-Antigen und TmpA P/N-Quotienten von 17,1, 7,4 bzw. 11,7 ermittelt.

Tabelle 4

Reinigung der rekombinanten Fusionsproteine 34 kD-Antigen, 47 kD-Antigen, TmpA, 17 kD-Antigen, TmpC und BMP über eine Ni-NTA-Sepharose-Säule

- + schwacher Elutionsgipfel bis 10 % der maximalen Absorption bei 280 nm
- ++ mittlerer Elutionsgipfel bis 50 % der maximalen Absorption bei 280 nm
- +++ starker Elutionspeak, größer als 50 % der maximalen Absorption bei 280 nm

Ca. 1 g Bakterienpellet aus induzierter Flüssigkultur wurde lysiert und das Säulenmaterial im Batch-Verfahren beladen. Die Fusionsproteine wurden im pH-Stufengradienten eluiert. Durch UV-Monitoring ($\lambda = 280 \text{ nm}$) wurden die Elutionsgipfel ermittelt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Densitometrie analysiert.

rAg	Elution Puffer D (pH 5.9)	Elution Puffer E (pH 4.5)	MG des eluierten Proteins (kD)	Ausbeute (mg Protein/ l Kultur)	Reinheit des Fusions- proteins (%)
34 kD	++	+++	31	68	99
47 kD	Ø	+++	47,5	34	80
TmpA	+	Ø	46,5	13	70
17 kD	Ø	++	19	11	99
TmpC	Ø	+	35	5	90
BMP	+	+++	39	40	80

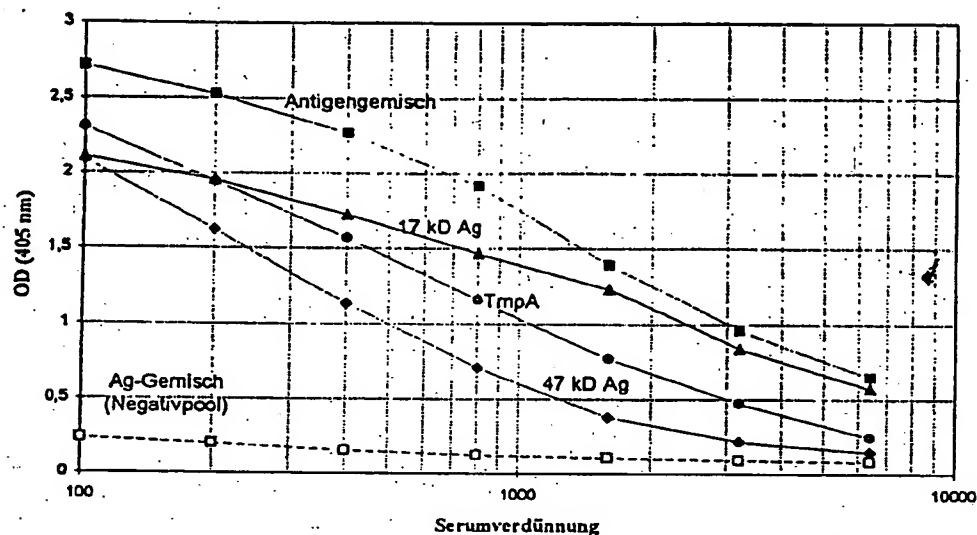
Tabelle 5

Gegenüberstellung der Ergebnisse von TPHA, CMT, FTA-Abs und Rekombinanten-Antigen-ELISAs.

Untersucht wurden Seren von Syphilispatienten mit Primärsyphilis (LI), Sekundärsyphilis (LII), Tertiärsyphilis (LIII), Lues latens (LLa). Die Ergebnisse im colorimetrischen Test (col. EIA) wurden in Extinktionseinheiten, für den chemilumineszenten Test (CL-EIA) in relativen Einheiten (Vielfaches der Chemilumineszenz eines negativen Referenzserums) angegeben.

Seren unterhalb des definierten Grenzwertes (Mittelwert + 3 Standardabweichungen von 37 - 42 Blutspendenserum) sind markiert.

Serum	CMT (Titer)	TPHA (Titer)	FTA-ABS (Titer)	17 kD-Ag col. EIA	17 kD-Ag CL-EIA	TmpA col. EIA	TmpA CL-EIA	47 kD-Ag col. EIA	47 kD-Ag CL-EIA	BMP CL-EIA	23 kD-Ag col. EIA	23 kD-Ag CL-EIA	3 Mix col. EIA	3 Mix CL-EIA
LI-2	64	5120	5	1,40	15,69	0,92	23,22	1,79	25,5	3,38	1,131	9,09		
LI-3	64	5120	10	2,34	24,51	2,42	38,91	2,07	33	27,96	2,114	13,68		
LI-4	8	160	5	0,86	10,86	0,86	15,27	0,41	5,4	4,08	1,083	3,63		
LI-5	64	20480	80	2,42	19,17	2,78	32,88	2,47	33,6	7,56	2,08	12,27		
LI-6	32	40960	160	2,42	20,64	1,62	20,07	1,45	18,9	11,25	2,07	10,92		
LI-7	64	5120	80	1,04	24,24	1,57	28,2	0,43	14,88	7,95	2,59	12,21		
LI-8	32	2560	160	2,49	19,56	2,62	36,6	1,57	16,35	8,91	2,69	11,52		
LI-9	64	855280	320	3,43	24,99	3,03	25,68	2,57	35,64	8,52	3,44	14,31		
LII-1	16	327680	5	2,44	19,44	0,24	7,74	0,53	3,48	2,01	1,149	10,35		
LII-2	64	20480	160	0,48	4,83	0,59	14,97	0,77	7,53	2,03	1,12	5,48		
LII-3	4	81920	5	2,32	19,11	0,58	9,93	0,37	5,25	4,14	1,154	9,48		
LII-4	64	163840	5	2,32	17,46	1,76	18,56	1,36	11,85	18,12	1,73	11,79		
LII-5/6	64	5120	640	1,84	21,18	2,54	37,5	2,03	41,07	7,59	2,34	12,42		
LII-8	32	81920	5	2,32	22,68	2,04	24,99	1,40	24,45	23,04	2,31	13,05		
LIII	16	10240	5	2,06	17,91	0,48	11,82	0,40	11,37	1,65	1,42	10,74		
LLa-2	1	2560	n.b.	1,63	16,41	0,27	5,37	0,12	1,92	0,99	0,94	4,29		
LLa-3	4	10240	10	2,22	20,28	0,74	9,6	0,66	7,38	0,78	1,134	9,66		
LLa-4	2	2560	5	2,20	19,02	0,6	7,44	0,44	1,76	0,9	0,92	1,14		
			Reaktive Seren	17 kD 16/18	17 kD 16/18	TmpA 15/18	TmpA 17/18	47 kD 16/18	47 kD 16/18	BMP 10/18	23 kD 17/18	3 Mix 17/18		
			Grenzwert (3s-Bereich)	0,25	2,27	10,33	2,8	10,22	2,77	2,43	10,36	3,4		

**Abb. 5:**

Vergleich der Einzelantigene 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen und TmpA mit dem Antigengemisch im colorimetrischen EIA.

Extinktionen in Abhängigkeit von der Serumverdünnung nach separater Beladung von 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen und TmpA im Einzelantigen-EIA (Beladungskonzentration 1 µg/ml) und nach gleichzeitiger Beladung mit diesen drei rekombinanten Antigenen (Beladungskonzentration je Antigen 1 µg/ml) im Mischantigen-EIA.

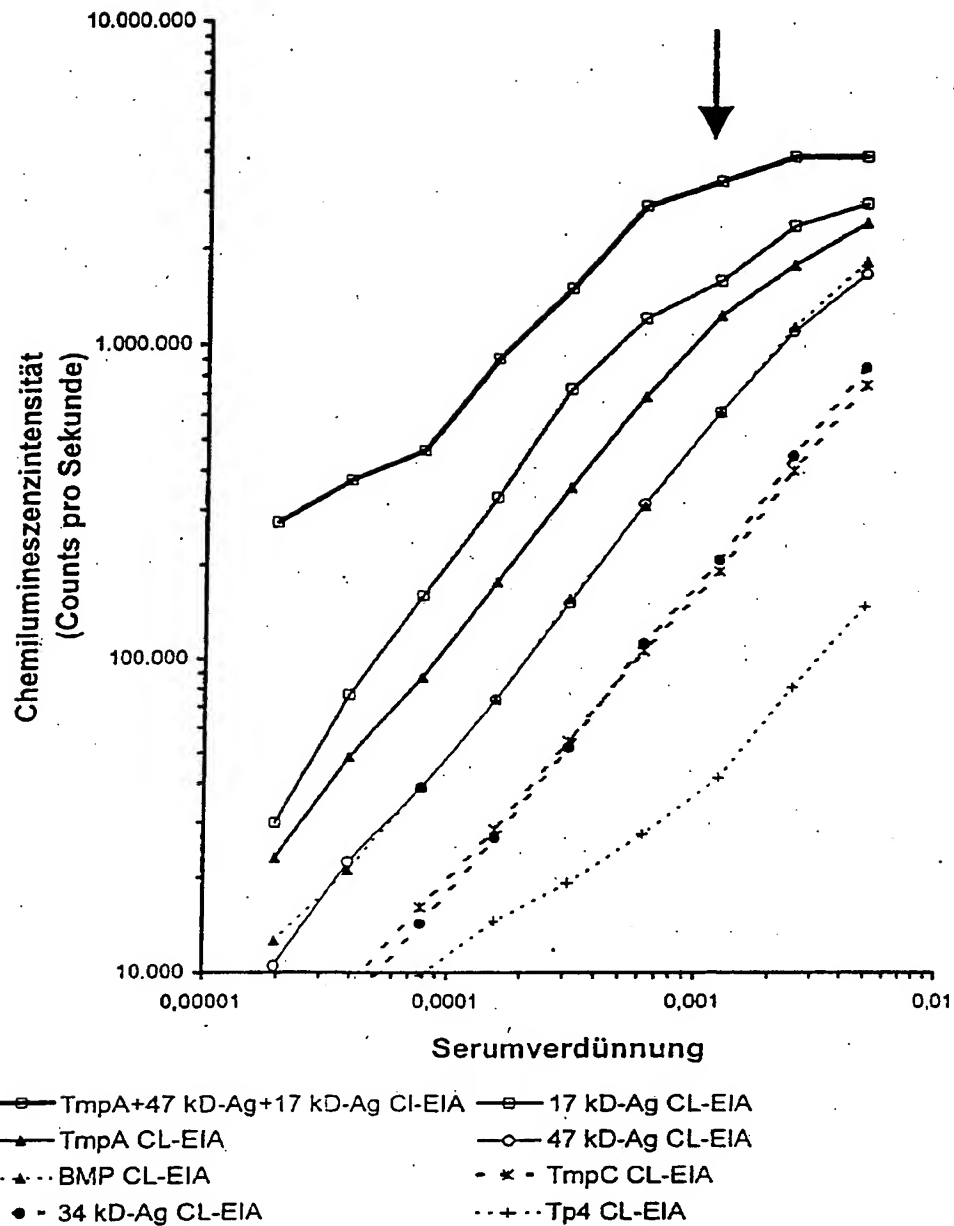


Abb. 6:

Abhängigkeit des Chemilumineszenzsignals von der Antikörperkonzentration.

Chemilumineszenz-EIA (CL-EIA) mit rekombinanten Einzelantigenen und Antigengemisch. Verdünnungen von Sekundärsyphilispoolserum, Standardverdünnung 1:800 durch Pfeil gekennzeichnet.

Tabelle 6

Chemilumineszenzymimmunttest (CL-EIA) mit und ohne Zusatz von rekombinantem Antigen zu einem Poolserum von Sekundärsyphilipatienten.

Angaben der Signalreduktion in % zum Ansatz ohne Blockierung (Serumverdünnung 1:12800, Antigenzusatz 1 µg/ml).

CL-EIA	Beladung von Mikrotiterplatten mit	Serum mit	Signalreduktion in % gegenüber nichtblockiertem Serum
mit einem rekombinanten Antigen	17 kD-Antigen	17 kD-Antigen	92
	47 kD-Antigen	47 kD-Antigen	98
	TmpA	TmpA	99
mit zwei rekombinanten Antigen	17 kD-Antigen 47 kD-Antigen	17 kD-Antigen	76
		47 kD-Antigen	-5
	17 kD-Antigen TmpA	17 kD-Antigen	55
		TmpA	36
	47 kD-Antigen TmpA	47 kD-Antigen	14
		TmpA	81
mit drei rekombinanten Antigenen	17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen, TmpA	17 kD-Antigen	44
		47 kD-Antigen	5
		TmpA	39

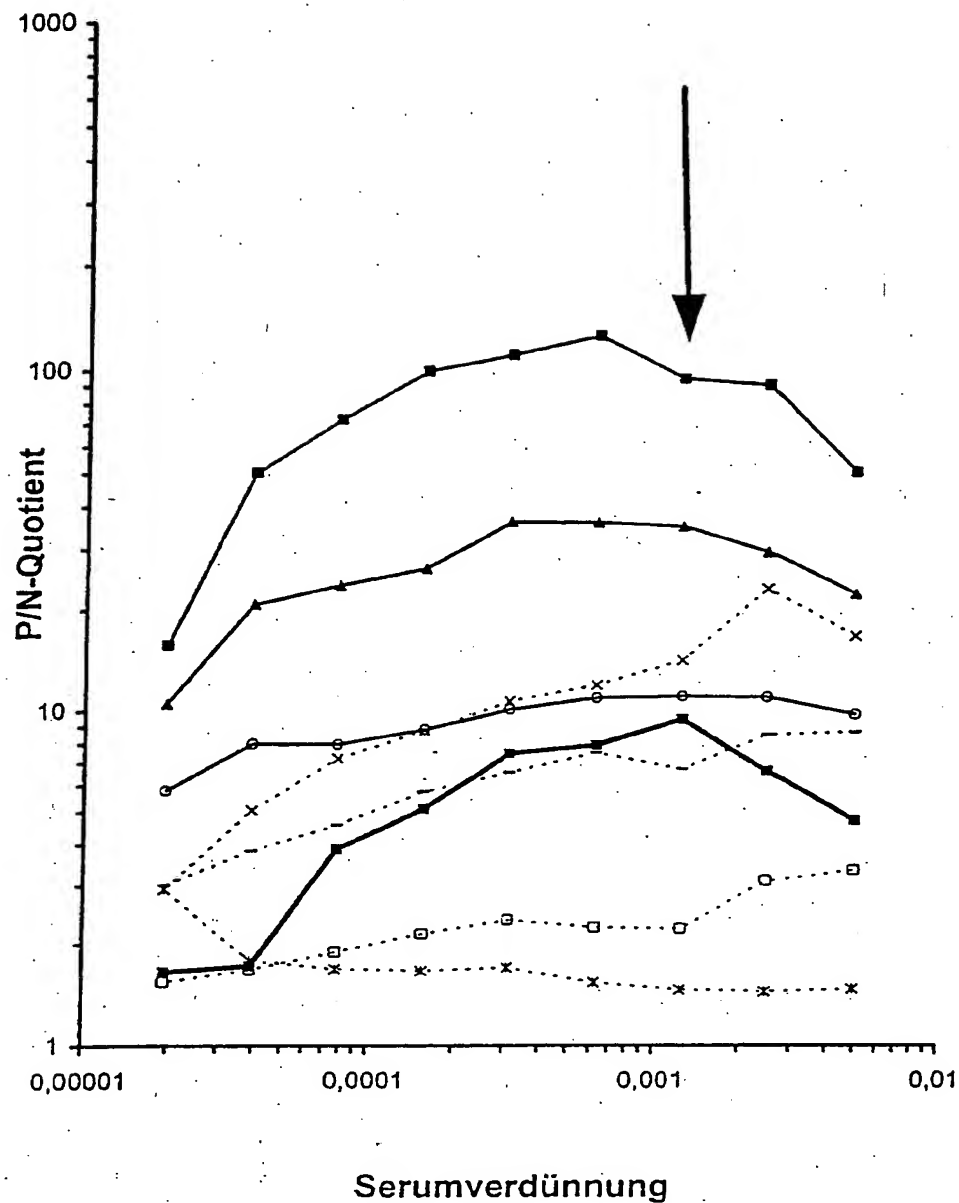


Abb. 7:

Abhängigkeit des P/N Quotienten im CL-EIA mit rekombinanten Antigenen von der Antikörperkonzentration.

Chemilumineszenz-EIA (CL-EIA) mit rekombinanten Einzelantigenen und Antigengemisch. Verdünnungen von Sekundärsyphilispoolserum, Standardverdünnung 1:800 durch Pfeil gekennzeichnet.

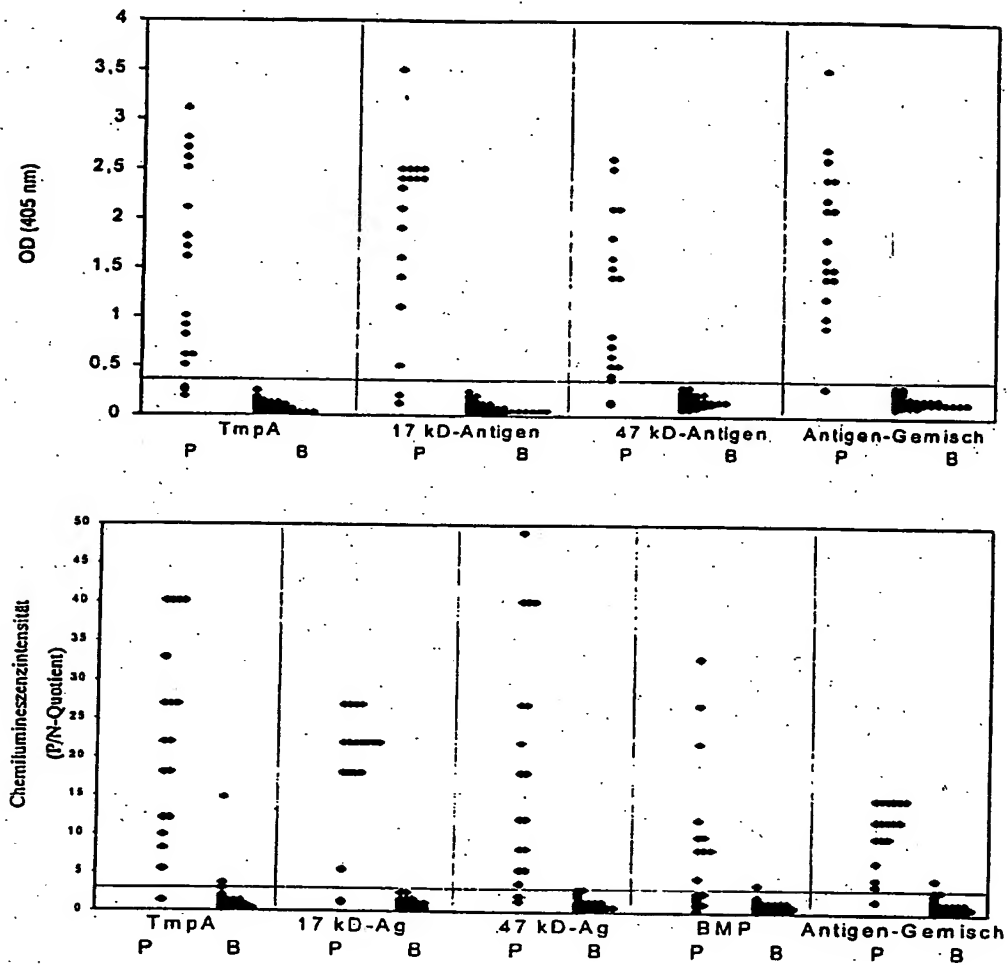


Abb. 8:

Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* durch EIA mit rekombinanten Antigenen und colorimetrischem bzw. Chemilumineszenzdetektionssystem.

A: Colorimetrischer EIA mit TmpA, 17 kD-Ag, 47 kD-Ag und Antigengemisch (17 kD-Ag+47 kD-Ag +TnpA). Extinktionen für Syphilispatientenserum aller Krankheitsstadien (P, n=18) im Vergleich zu Blutspendern (B, n=38), Grenzwertfestlegung mit 3 Standardabweichungen über dem Blutspendermittelwert

B: Chemilumineszenz-EIA mit TmpA, 17 kD-Ag, 47 kD-Ag, BMP und Antigengemisch (17 kD-Ag+47 kD-Ag +TnpA). Untersuchung von Syphilispatientenserum aller Krankheitsstadien (P, n=18) im Vergleich zu Blutspendern (B, n=38) als Quotient der Chemilumineszenz der untersuchten Seren und einem negativen Referenzserum (P/N-Quotient). Der Grenzwert 3,5 liegt für alle CL-ELAS mehr als drei Standardabweichungen über dem Blutspendermittelwert (siehe Tab. 5).

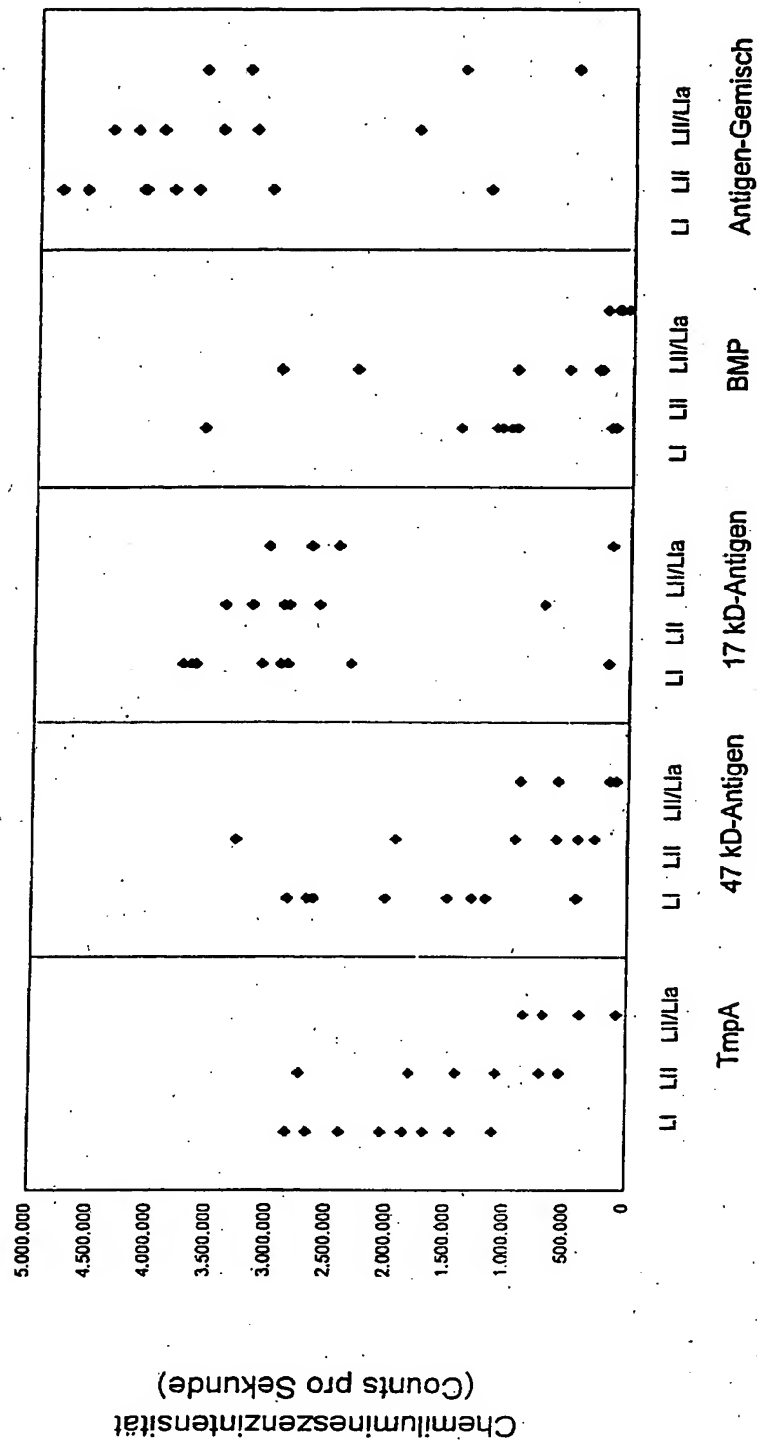


Abb. 9: Chemilumineszenz-ELISA.
Antikörper gegen rekombinante Einzelantigene von *T. pallidum* und einem Antigengemisch (TmpA, 17 kD- und 47 kD-Antigen) bei Primärsyphilis (LI), Sekundärsyphilis (LII) und Tertiärsyphilis/Lues latens (LII/LIa).